

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

09/403092



PRIORITY DOCUMENT

REC'D	22 JUN 1998
WIPO	PCT

**Bescheinigung**

Die Hoechst Aktiengesellschaft in Frankfurt am Main/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Dictyocaulus viviparus Antigen zur Diagnose des Lungenwurmbefalls und zur Vakzinierung"

am 15. April 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole C 07 K, A 61 K und C 07 H der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 4. Dezember 1997

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Kel

Aktenzeichen: 197 15 586.3

Hoechst Aktiengesellschaft  
HOE 97/F 097  
Beschreibung  
5 Dictyocaulus viviparus Antigen zur Diagnose des Lungenwurmbefalls und zur Vakzinierung.

<sup>1</sup> Mschr. 76: ... -476). Die Atmung wird, auch durch die in den oberen Atemwegen zu Obstruktionen führenden adulten Stadien, erheblich erschwert. Sichtbare Folgen der starken Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens sind verminderte Gewichtszunahmen oder gar Gewichtsverluste verbunden mit Wachstumsverzögerungen. Bisweilen verschlimmern sich die klinischen Symptome dramatisch und führen rasch zum Tod.

Die Erfindung betrifft ein Antigen aus den adulten Stadien des Lungenwurms Dictyocaulus viviparus (im folgenden auch D. viviparus oder Dictyocaulus genannt) des Rindes, mit dem man immundiagnostisch Lungenwurmbefall bei Rindern nachweisen kann. In einer Vakzine kann das Antigen Immunschutz gegen D. viviparus hervorrufen.

10 Lungenwürmer haben insbesondere bei kleinen und großen Wiederkäuern eine große pathogene und wirtschaftliche Bedeutung. Dictyocaulus ist der einzige beim Rind Geschlechtsreihe erlangende Lungenwurm. Er kommt weltweit dort vor, wo zumindest zeitweise gemäßigte Temperaturen von 15-20°C herrschen. Endemisch ist D. viviparus in Europa in den großen Flussauen, regenreichen Küstengebieten aber auch auf alpinen Almen verbreitet (R.J. Jørgensen (1980) Vet. Parasitol. 7, 153-167; H. Pfeiffer (1976) Wien. Tierärzl. Mschr. 63: 54-55). In den Niederlanden wurde z.B. bei über 77 % der auf Weiden gehaltenen Kälbergruppen klinische Dictyocaulose festgestellt (J. Boch, R. Supperer (1992) Veterinärmedizinische Parasitologie. 4. Aufl., Parey, Berlin, S. 294-301).

15 Lungenwürmer haben insbesondere bei kleinen und großen Wiederkäuern eine große pathogene und wirtschaftliche Bedeutung. Dictyocaulus ist der einzige beim Rind Geschlechtsreihe erlangende Lungenwurm. Er kommt weltweit dort vor, wo zumindest zeitweise gemäßigte Temperaturen von 15-20°C herrschen. Endemisch ist D. viviparus in Europa in den großen Flussauen, regenreichen Küstengebieten aber auch auf alpinen Almen verbreitet (R.J. Jørgensen (1980) Vet. Parasitol. 7, 153-167; H. Pfeiffer (1976) Wien. Tierärzl. Mschr. 63: 54-55). In den Niederlanden wurde z.B. bei über 77 % der auf Weiden gehaltenen Kälbergruppen klinische Dictyocaulose festgestellt (J. Boch, R. Supperer (1992) Veterinärmedizinische Parasitologie. 4. Aufl., Parey, Berlin, S. 294-301).

20 Die Aufnahme der dritten Larven mit dem Weidegras verursacht beim erstmales exponierten Kalb die Erkrankung (Dictyocaulose). Die Larven erreichen auf dem Blutweg die Alveolen der Lungen, die sie durchbrechen, um in die luftführenden Teile der Lunge zu gelangen. Dabei werden Läsionen erzeugt, die als Eintrittspforte für bakterielle Sekundärinfektionen dienen; die Vermehrung von Bakterien und anderer mikrobieller Erreger führt zu begrenzten oder generalisierten Lungeneinzündungen mit allen möglichen Folgeerscheinungen wie Lungenödем und Herzversagen (T. Schnieder, A. Bellmer, F.-J. Kaup (1989) Wien. Tierärzt.

25 Mschr. 76: ... -476). Die Atmung wird, auch durch die in den oberen Atemwegen zu Obstruktionen führenden adulten Stadien, erheblich erschwert. Sichtbare Folgen der starken Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens sind verminderte Gewichtszunahmen oder gar Gewichtsverluste verbunden mit Wachstumsverzögerungen. Bisweilen verschlimmern sich die klinischen Symptome dramatisch und führen rasch zum Tod.

30 Die Lungenwurmerkrankung der Rinder kann anhand der klinischen Symptomatik (G. Gräfner (1987) Monatsh. Vet. med. 42: 178-181) oder anhand der mit dem Kot ausgeschiedenen Larven diagnostiziert werden (J. Boch, R. Supperer (1992). Diese Möglichkeiten eignen sich vor allem für die Diagnose am Einzeltier, wenn eine starke Infektion vorliegt. Zu der modernen Massentierzahllung werden jedoch, basierend auf einer geeigneten Diagnostik, epidemiologische Voraussagen und Risikoabschätzungen bezüglich des Ausbruchs einer Dictyocaulose in der fortgeschrittenen Weidesaison benötigt; d.h. in Surveys müssen viele, möglicherweise noch schwach infizierte Kalber mit einer sicheren, sensiblen Methode untersucht werden. Hierzu sind serologische Methoden geeignet (A. Bellmer, T. Schnieder, A.M. Tenter (1989) Proc. 13<sup>th</sup> Conf. Wild Ass. Adv. Vet. Parasit., S. 33, Berlin, 07.-11.08.1989). In Dictyocaulus viviparus identifizierte, isoliert und teilweise rekombinant dargestellte Antigene werden zur Serodiagnostik genutzt. Für die Heilbehandlung der Dictyocaulose können gegen adulte und juvenile Stadien wirksame Medikamente eingesetzt werden (z.B. Levamisol®, Pro Benzimidazole, Netomin®, Ivermectin®). Diese Präparate sind hochwirksam und können somit durch akute Lungenwurmerkrankungen bedingte Ausfälle meist verhindern (H. Mehlhorn, D. Düwel, W. Raether (1993) Diagnose und Therapie der Parasiten von Haus-, Nutz- und Heimtieren. 2. Aufl. Gustav Fischer Verlag, S. 223-227). Bei einer prophylaktischen/metaphylaktischen Behandlung lassen die Wirkstoffe aufgrund ihrer radikalen Wirksamkeit möglicherweise die Auseinandersetzung des Parasiten mit dem Immunsystem des Wirtes und somit die Ausbildung und Aufrechterhaltung einer belastbaren (Teil) Immunität nicht zu. Die Tiere sind dann einer Infektion im zweiten Weidejahr ungeschützt ausgesetzt (COBS, D.E., S.R. Pitt, J. Förster, M.T. Fox (1987) Res. Vet. Sci. 43: 273-275).

Deshalb wird in letzter Zeit aus epidemiologischer Sicht immer häufiger eine

**Immunisierung der Kälber der ersten Weidesaison gefordert, entweder durch geringgradige subklinische Infektion oder durch Vakzinierung. Zur Zeit steht nur eine Lebendvakzine in Form röntgenattenuierter Larven zur Verfügung, die**

Grundimmunität hervorruft, die durch weitere natürliche Infektion aufrecht erhalten werden muß (Mehlhorn H., et al., (1993)). Bei ungenügender Nachimmunisierung über natürliche Infektion kommen gelegentlich bei plötzlicher, starker Exposition Durchbrüche mit Husten und Erkrankungen vor. Da die Vakzine selbst im Kühlschrank nur etwa 3 Wochen haltbar ist, muß sie sorgfältig aufbewahrt und rasch eingesetzt werden. Dieses Procedere verbietet einen „flächendeckenden“ Einsatz, die Vakzine bleibt deshalb in erster Linie speziellen Endmitigebisten vorbehalten. Aufgrund der mangelnden Stabilität und Qualität ist die Entwicklung definierter Vakzinen (Subunitvakzine) erforderlich. Es stelle sich nun die Aufgabe, die aufgeführten Nachteile der derzeitigen Vakzinierungsmethode durch Bereitstellung eines neuen, vorteilhaften Impfstoffes zu beseitigen. Diese Aufgabe wurde durch die vorliegende Erfindung gelöst.

Die Erfindung betrifft ein neues, immunogenes, natives Protein, genannt DV 17,

welches aus adulten Würmern von *Dicyocoetus viviparus* isoliert wurde. Seine Immunogenität begründet sich vor allem dadurch, daß es nach subcutaner Applikation im Rind eine Antikörperantwort induziert, die dem Tier Immunschutz verleiht. Ferner kann dieses Protein im ELISA zur retrospektiven Immundiagnose der Dicyokolose im Rind verwendet werden. DV 17 ist durch folgende physikalische Eigenschaften charakterisiert. Das Protein ist beständig in allen

verwendeten Puffern. Eine Verminderung der Immunreaktivität nach Tiegefrierung ( $-85^{\circ}\text{C}$ ) des gereinigten Antigens konnte nicht festgestellt werden. Für Antigen DV 17 wurde unter Verwendung eines HPLC-Systems und einer Nucleosil C 18-Säule (150 mm x 4.6 mm; 5  $\mu\text{l}$ ) eine Retentionszeit von 14 min. gemessen (Gradientenelution bestehend aus Aqua dest / 0.1 % TFA (= 0 % B) und Acetonitril

/ 0.1 % TFA (= 100 % B)). DV 17 hat im SDS-Polyacrylamidgel (Phasigel 8-25 %) ein geschätztes Molekulargewicht von ca. 16500 dalton. Der isoelektrische Punkt von DV 17 liegt im Bereich von 5-3.5-9. Letztlich wurden nach Proteolyse mit Endoglykidasen Lys C folgende Teilaminoäuresequenzen ermittelt:

4

1 Ser Glu Ser Leu Tyr Glu · Lys (SEQ ID NO.: 1)

1 5

Sequence 2							
Met	Met	Asp	Asn	Phe	Val	Lys	(SEQ ID NO.: 2)
1				5			10
Tyr	Lys	Asp	Glu	Asn	Glu	Phe	
						Met	Asp
							Ala
				14			
Leu	Lys	Gln					

	1	5	10
Tyr	Asp	Ile	Pro
Ile	Pro	Gln	Asn
			Val
			Ala
			Glu
			Arg
			Glu
			His
			Leu
			Lys

1	Phe	His	Ala	Glu	Leu	Leu	Ala	Gly	Ile	Lys	10
	Pro	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Lys	Leu	Lys	Lys	(SEQ ID NO.: 6)

- 1                        5                        10  
 Gln      Phe      Pro      Ile      Leu      Thr      Ser      Val      Phe      Ser  
 (SEQ ID NO.: 7)  
 Asn      Glu      Glu      Lys
- 5                        Als biologische Eigenschaft ist die Entwicklungshemmung von Dictyocaulus viviparus im Rind nach Vakzination herausragend.  
 Die Erfinndung hat daher zum Gegenstand ein immunogenes Protein mit protektiver Wirkung, welches aus adulten Würmern des Lungenwurms Dictyocaulus viviparus isoliert wird und welches bevorzugt ein Molekulargewicht von 15000-18000 Da, einen isoelektrischen Punkt zwischen 5.3-5.9 und Aminosäureteilesequenzen gemäß Tabelle 1 aufweist.
- 10                        Ein vorzugsweiser Gegenstand der Erfinndung ist ein Protein, welches ein Molekulargewicht von  $16500 \pm 1500$  Da und / oder einen isoelektrischen Punkt von 5.6 hat.
- 15                        Ein weiterer Gegenstand der Erfinndung ist ein Verfahren zur Isolierung eines Proteins bei dem die Isolierung mit Hilfe von dem Fachmann bekannten Extraktionsmethoden und chromatographischen Methoden durchgeführt wird.
- 20                        Ein weiterer Gegenstand der Erfinndung ist eine DNA, kodierend für ein Protein wie oben beschrieben, vorzugsweise eine DNA, die eine DNA-Sequenz gemäß Tabelle 1 enthält.
- 25                        Ferner ist Gegenstand der Erfinndung ein Verfahren zur Isolierung der genannten DNA, bei welchem
- 30                        a) degenerierte Oligonukleotide, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß Tabelle 1 oder Teile davon hergestellt werden,
- b) die gemäß a) hergestellten Oligonukleotide radioaktiv oder nicht-radioaktiv markiert werden und
- c) aus einer cDNA-Bank, hergestellt aus Dictyocaulus viviparus, cDNA-Klone isoliert werden, die mit den nach b) hergestellten Hybridisierungsproben unter stringenten Bedingungen hybridisieren.
- Ein weiterer Gegenstand der Erfinndung ist ein Verfahren zur Isolierung der genannten DNA, bei welchem
- 10                        a) PCR-Primer, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß Tabelle 1 oder Teile davon oder enthaltend eine Oligo-dT-Sequenz hergestellt werden,
- b) mit den so erzeugten PCR-Primeren aus einer cDNA-Bank, hergestellt aus Dictyocaulus viviparus, PCR-Fragmente generiert werden,
- c) welche kloniert und nach gängigen Methoden analysiert werden und
- d) zur Vervollständigung der cDNA-Sequenz durch Hybridisierungsverfahren wie oben beschrieben an Stelle der degenerierten Oligonukleotide verwendet werden.
- Das zuletzt beschriebene Verfahren kann auch so abgewandelt werden, daß für die PCR-Reaktion als Matrize RNA benutzt wird, die in einem zusätzlichen Schritt zunächst revers transkribiert und der so entstandene cDNA-Erststrang zur PCR verwendet wird.
- Ein weiterer Gegenstand der Erfinndung ist ein rekombinantes Protein, enthaltend Aminosäureteilesequenzen gemäß Tabelle 1, welches vorzugsweise durch Expression einer wie oben beschrieben erhaltenen cDNA in Prokaryonten oder Eukaryonten und Aufreinigung nach dem Fachmann bekannten Methoden erhältlich ist.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein immunochemisches Verfahren unter Verwendung des oben beschriebenen Proteins von *D. viviparus*, mit welchem die Menge an DV 17 spezifischen Antikörpern im Blut von Rindern bestimmt wird, indem man mit DV 17 beschichtete ELISA-Platten mit zu untersuchendem Rinderserum inkubiert und gegebenenfalls gebildete DV 17 / Antikörper-komplexe durch Peroxidase-konjugierte, polyklonale Antikörper und eine entsprechende, dem Fachmann bekannte Farbreaktion nachweist.

Ein anderer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung des oben beschriebenen Proteins von *D. viviparus* als Vakzine, verbunden mit einem Carrier oder Adjuvans und ggf. Hilfsstoffen zur Immunisierung von Rindern gegen Dictyocaulose. Ein anderer Gegenstand der Erfindung ist ein Diagnostik-Kit, enthaltend das oben beschriebene Protein von *D. viviparus*. Schließlich ist ein Gegenstand der Erfindung eine Vakzine, enthaltend das oben beschriebene Protein von *D. viviparus* sowie einen Carrier, ein Adjuvans sowie ggf. Hilfsstoffe.

Die Erfindung wird nun anhand von Beispielen näher erläutert, ohne darauf beschränkt zu sein. Die Tabelle ist wie folgt beschrieben:

Tabelle 1: Teilaminosäuresequenzen des isolierten DV 17-Proteins aus Dictyocaulus viviparus und die daraus ableitbare degenerierte Nukleotidsequenz. Abkürzungen:  
 $N = A, G, C, T; Y = T, C; H = A, C, T; R = A, G; M = A, C$

Für die Identifizierung von Protein DV 17 wurden Normalseren und Infektionsseren von Rindern verwendet, die mit gastrointestinalen Nematoden wie *Ostertagia ostertagi* und *Cooperia oncophora* sowie dem Lungewurm *Dictyocaulus viviparus* infiziert waren.

- 7 Chromatographisch aufgetrennte Proteinfraktionen gewonnen aus homogenisierten, adulten Lungewürmern wurden mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelektrophorese weiter aufgetrennt und auf Immobilion P-Membranen immobilisiert (Semidry-Blotting). Das lungewurmspezifische Protein DV 17 wurde anschließend mit den 8 spezifischen Infektionsseren detektiert und mittels Umkehrphasen-HPLC-Säule weiter aufgereinigt. Die Reinheit der Proteinfraktion wurde in silber-gefärbten SDS-Polyacrylamidgeleien (Phasigele) überprüft. Mittels BCA-Proteinassay wurde die Proteinkonzentration in elektrophoretisch reinen DV 17-Fraktionen bestimmt und bei -85°C tiefgefroren. Helminthennaive Rinder wurden 2 mal mit jeweils einer definierten Menge von gereinigtem DV 17 vakziniert. Die Rinder wurden 1 Woche nach der zweiten Vakzination mit L3-Larven von *Dictyocaulus viviparus* belastet (Challenge). Nicht vakzinierter Tiere dienten als Kontrolle. 4 Wochen nach dem Challenge wurden die Rinder geschlachtet, in der Lunge die Anzahl adulter Würmer bestimmt und die Länge der männlichen und weiblichen Würmer gemessen. Als Maß für den Immunenschutz wurde die Reduktion der Anzahl adulter Würmer im Vergleich zur nicht vakzinierter Kontrolle definiert.
- 9 „Stringente Bedingungen“ in Zusammenhang mit DNA-Hybridisierung bedeutet in der vorliegenden Anmeldung 6xSSC, 68°C.
- 10 Die PCR-Bedingungen sind nach jedem Fachmann bekannten Methoden in 10 Vorversuchen zu bestimmen.
- 11 Beispiel 1: Herstellung von Infektionsseren
- 12 Helminthennaive Rinder im Alter von 6 Monaten wurden mit unterschiedlichen Dosen von dritten Larven verschiedener Nematodenspezies (*Dictyocaulus viviparus*, *Ostertagia ostertagi*, *Cooperia oncophora*) infiziert. Die Infektions-dosen betrugen in der Dictyocaulus-Gruppe 2500, 1250 und 500 Larven / Rind; je Dosis wurden 3 Tiere verwendet. Für die Ostertagia-Gruppe wurden Infektionsdosen von 70 000, 30 000 und 15 000 Larven / Rind gewählt. Neben einer nicht infizierten Gruppe (= Negativkontrolle) wurde zusätzlich eine gemischte Gruppe mitgeführt, in 12

<sup>9</sup> der jedes Rind mit 2 500 Dictyocaulus Larven, 10 000 Ostertagia Larven und 10 000 Cooperia Larven infiziert wurde. An den Tagen D0 (= Tag der Infektion), D +21, D +40, D +56, D +70, D +84, D +98 und D +112 wurden von jedem Rind Serumproben gewonnen, die aliquotiert bei -25°C aufbewahrt wurden. Die Seren wurden zur Identifizierung des Dictyocaulusantigens DV 17 in elektrophoretisch, chromatographisch aufgetrennten Proteinfraktionen sowie zur Beurteilung der Spezifität verwendet.

10 Beispiel 2: Gewinnung adulter Lungenwürmer

6 Monate alte, helminthennaue Rinder wurden mit jeweils 5000 dritten Larven von Dictyocaulus viviparus oral infiziert; am darauffolgenden Tag erhielten die Tiere die gleiche Infektionsdosis. 28 Tage nach der Infektion wurden die Rinder geschlachtet und nach der Sektion adulte Würmer aus den Lungen gesammelt. Die Würmer wurden anschließend 3x mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen, gewogen und bei -85°C bis zur Aufarbeitung gelagert.

20 Beispiel 3: Extraktion von DV 17 aus adulten Lungenwürmern

10 g gefrorene Wurmmasse wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend mit 40 ml 0.025 M Tris-HCl-Lösung pH 7.4 + 2 mM Pefabloc® im Gewebehomogenisator homogenisiert. Zur Entfernung grober Gewebe-bestandteile wurde das Homogenat bei 3010 g und 4°C 15 min zentrifugiert und das Pellet verworfen. Der Überstand wurde bei 4°C für 20 min bei 39 800 g zentrifugiert und der Überstand unter den gleichen Bedingungen 10 min rezentrifugiert. Der klare Überstand wurde nach Filtration mit 1.2 µm-Filtern in 1 Liter phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) über Nacht bei 4°C dialysiert (cut off der Dialysemembran 8000).

Beispiel 4: Präparative Gelfiltration

10 Der dialysierte Überstand wurde bei 39 800 g 15 min zentrifugiert und der klare Überstand im Pharmacia-FPLC-System mittels präparativer Gelfiltrationsäule (Säulentyp XK 16 / 60; Trennmedium: Superdex 75 prep grade, Säulenvolumen: 124 ml) aufgetrennt. Zur Elution wurde PBS pH 7.4 verwendet. Die Fraktionen mit den Retentionsvolumina 65 - 75 ml wurden gesammelt und mit Ultra-filtrationsmodulen (cut off 3000) aufkonzentriert. Mit einem amplifizierten Western Blot wurde Protein DV 17 nachgewiesen.

Beispiel 5: Western Blot-Analyse

15 Die aufkonzentrierte Superdex 75 prep grade-Fraktion wurde im Verhältnis 1:2 mit reduziertem SDS-Puffer gemischt; davon wurden jeweils 40 µl / Probenvertiefung auf ein SDS-Exzégelel (Fa. Pharmacia) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in der Multiphor II-Kammer (Fa. Pharmacia) unter standardisierten Laufbedingungen (607 V, 50 mA, 30 W, Laufzeit: 90 min) durchgeführt. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mittels „Semidry-Blotting“ (Tovey ER, Baldo BA, Electrophoresis, 8, 1987, 384-387) auf Immobilon P-Membranen transferiert (Transferbedingungen: 4.5 min, konstante Stromstärke 0.8 mA / cm<sup>2</sup>) und nach einer 24 stündigen Blockphase mit 3 %igem Rinderserumalbumin in Tris gepufferter Kochsalzlösung (TBS) mit einem Dictyocaulus-specifischen Immunserum (gewonnen am D+40, siehe Beispiel 1) in einer Verdünnung von 1:20 1 Stunde inkubiert. Als Negativ-kontrolle wurde 25 Rindernormalserum (Verdünnung 1:20 verwendet). Nach 3 maligem Waschen mit TBS + 0.05 % Tween 20 wurde die Blotfolie mit einem Biotin-markierten Ziege anti-Rind IgG (H+L) Antikörper (1:500; Fa. Pierce) für 1 Stunde inkubiert. Nach 3-maligem Waschen (TBS + 0.05 % Tween 20) erfolgte eine 1 stündige Inkubation mit dem Enzymkonjugat Biotin-Streptavidin-Alkalische Phosphatase (1:2500; Fa. Pierce). Die Substratentwicklung wurde mit dem Substratkit der Fa. Biologics durchgeführt.

**Beispiel 6: Umkehrphasen - HPLC**

<sup>12</sup> mit definiertem, isoelektrischem Punkt (pH 3.5 - 9.3 Fa. Pharmacia) mitgeführt. Es ergab sich ein isoelektrischer Punkt von 5.3 - 5.9.

Nach der immunologischen Identifizierung von DV 17 in den präparativen

Gelfiltrationsfraktionen wurde das Protein mittels HPLC weiter aufgereinigt. Zu diesem Zweck wurde eine Nucleosil C 18 5U-Säule der Firma Altech verwendet (150 mm x 4.6 mm). Das Protein wurde mit Hilfe eines linearen Puffergradienten eluiert (Puffer A: Reinstwasser +0.1 % Trifluoressigsäure (TFA); Puffer B: Acetonitril + 0.1 % TFA). 500 µl der in Beispiel 4 aufkonzentrierten Fraktion wurden mit Puffer A:1:2 verdünnt und dann in die Säule injiziert. Die Flußrate betrug 0.5 ml / min. Die Gradientenelution wurde 5 min nach Injektion gestartet und 10 min später beendet.

Für DV 17 wurde eine Retentionszeit von 14 min gemessen.

**Beispiel 7: Reinheitsnachweis und Molekulargewichtsbestimmung**

5 Diesem Zweck wurde eine Nucleosil C 18 5U-Säule der Firma Altech verwendet (150 mm x 4.6 mm). Das Protein wurde mit Hilfe eines linearen Puffergradienten eluiert (Puffer A: Reinstwasser +0.1 % Trifluoressigsäure (TFA); Puffer B: Acetonitril + 0.1 % TFA). 500 µl der in Beispiel 4 aufkonzentrierten Fraktion wurden mit Puffer A:1:2 verdünnt und dann in die Säule injiziert. Die Flußrate betrug 0.5 ml / min. Die Gradientenelution wurde 5 min nach Injektion gestartet und 10 min später beendet.  
Für DV 17 wurde eine Retentionszeit von 14 min gemessen.

15	1.	Ser	Glü	Ser	Leu	Tyr	Glü	Lys	(SEQ ID NO.: 1)
20	2.	Met	Met	Asp	Asn	Phø	Val	Lys	(SEQ ID NO.: 2)
25	3.	Tyr	Lys	Asp	Glü	Asn	Phø	Met	Asp
30	4.	Tyr	Asp	Ile	Pro	Glü	Tyr	Arg	Glü
35	Ile	Pro	Gln	Asn	Val	Ala	Glu	His	Leu
40									Lys

**Beispiel 8: Bestimmung des isoelektrischen Punktes**

Gemäß Beispiel 6 isoliertes DV 17 wurde mit Reinstwasser verdünnt und auf vorgefertigte Fokussiergele (IEF Phastgele pH 3 - 10, Fa. Pharmacia) aufge-tragen. Die Fokussierung im Phastsystem erfolgte unter standardisierten Bedingungen. Zwecks Bestimmung des isoelektrischen Punktes von DV 17 wurden Markerproteine

**Beispiel 11:** ELISA zum serologischen Nachweis einer Dictyokaulose

## Beispiel 10: Nachweis eines protektiven Effekts von DV 17

**Reinstwasser + 1 Tablette ABTS ( $\leq 50$  mg ABTS). Die Substratentwicklung erfolgt bei Raumtemperatur und wurde im ELISA-Reader alle 10 min bei 414 nm überwacht. Dicystocaulus-specifische Antikörper waren im ELISA frühestens 28' nach einer Lungenenwurminfektion nachweisbar.**

Tabelle 1

Larven von *Dicyocoelius viviparus* belastet (= Challenge). Nicht vakzinierter Tiere dienten als Kontrolle. 35 Tage nach dem Challenge wurden die Tiere geschlachtet und in der Lunge die Anzahl adulter Würmer bestimmt; gleichzeitig wurde die Länge intakter männlicher und weiblicher Würmer gemessen. In der vakzinierten Gruppe wurde eine um 80 % reduzierte Anzahl adulter Würmer gefunden. Adulte Würmer aus der vakzinierten Gruppe waren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant kleiner (Reduktion 33 %).



## Patentansprüche:

1. Immunogenes Protein DV 17 mit protektiver Wirkung, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein aus adulten Würmern des Lungenwurms *Dictyocaulus viviparus* isoliert wird.
  2. Protein, gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das genannte Protein ein Molekulargewicht von 15 000 - 18 000 dalton, einen isoelektrischen Punkt zwischen 5.3 und 5.9 und Aminosäureteilsequenzen gemäß Tabelle 1 aufweist.
  3. Protein, gemäß einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß das genannte Protein ein Molekulargewicht von  $16\ 500 \pm 1\ 500$  dalton hat.
  4. Protein, gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das genannte Protein einen isoelektrischen Punkt von 5.6 hat.
  5. Verfahren zur Isolierung eines Proteins, gemäß einem der Ansprüche bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Isolierung mit Hilfe von Extraktionsmethoden und chromatographischen Methoden durchgeführt wird.
  6. DNA, kodierend für ein Protein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4.
  7. DNA, gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine DNA-Sequenz gemäß Tabelle 1 enthält.
  8. Verfahren zur Isolierung einer DNA gemäß Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß
  9. Verfahren zur Isolierung einer DNA gemäß Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß
  10. PCR-Primer, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß Tabelle 1 oder Teile davon oder enthaltend eine Oligo-dT-Sequenz, hergestellt werden,
  11. Rekombinantes Protein, enthaltend Aminosäureteilsequenzen gemäß Tabelle 1.
  12. Rekombinantes Protein, erhältlich durch Expression einer nach einem der Ansprüche 8 bis 10 erhaltenen cDNA in Prokaryonten oder Eukaryonten und Aufreinigung.
- <sup>18</sup>
- b) die hergestellten Oligonukleotide radioaktiv oder nicht-radioaktiv markiert werden und
- c) aus einer cDNA-Bank, hergestellt aus *Dictyocaulus viviparus*, cDNA-Klone isoliert, die mit den nach b) hergestellten Hybridisierungs-proben unter stringenter Bedingungen hybridisieren.
- <sup>5</sup>
- <sup>10</sup>
- <sup>15</sup>
- <sup>20</sup>
- <sup>25</sup>
- <sup>30</sup>

SEQUENZPROTOKOLL

13. Immunchemisches Verfahren zur Bestimmung der Menge von DV 17 spezifischen Antikörpern im Blut von Rindern unter Verwendung eines Proteins, gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß mit DV 17 beschichtete ELISA-Platten mit zu untersuchendem Rinderserum inkubiert werden und gegebenenfalls gebildete DV 17 / Antikörperkomplexe mit Peroxidase-konjugierten, polyklonalen Antikörpern und einer Farbreaktion nachgewiesen werden.

14. Verwendung eines Proteins, gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, 11 oder 12 als Vakzine verbunden mit einem Carrier oder Adjuvans und ggf. Hilfsstoffen zur Immunisierung von Rindern gegen Dictyocaulus.

15. Diagnostik-Kit enthaltend ein Protein gemäß einem der Ansprüche 1 - 4, 11 oder 12.

16. Vakzine, enthaltend ein Protein gemäß einem der Ansprüche 1 - 4, 11 oder 12 sowie einen Carrier, ein Adjuvans sowie aaf. Hilfsstoffe.

		Ile Pro Gln Asn Val Ala Glu His Leu Lys
(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:		20
(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:		25
(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren		
(B) ART: Aminosäure		
(C) STRANGFORM: Einzel		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein		
(ix) MERkmale:		
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein		
(B) LAGE: 1..14		
(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:		
(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:		
(A) LÄNGE: 20 Aminosäuren		
(B) ART: Aminosäure		
(C) STRANGFORM: Einzel		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein		
(ix) MERkmale:		
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein		
(B) LAGE: 1..20		
(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:		
(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:		
(A) LÄNGE: 26 Aminosäuren		
(B) ART: Aminosäure		
(C) STRANGFORM: Einzel		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein		
(ix) MERkmale:		
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein		
(B) LAGE: 1..26		
(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:		
(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:		
(A) LÄNGE: 18 Aminosäuren		
(B) ART: Aminosäure		
(C) STRANGFORM: Einzel		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein		
(ix) MERkmale:		
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein		
(B) LAGE: 1..18		
(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:		
(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:		
(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren		
(B) ART: Aminosäure		
(C) STRANGFORM: Einzel		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein		
(ix) MERkmale:		
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein		
(B) LAGE: 1..14		
(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:		
(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:		
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare		
(B) ART: Nukleinäure		
(C) STRANGFORM: Einzel		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)		
(ix) MERkmale:		
(A) NAME/SCHLÜSSEL: exon		
(B) LAGE: 1..21		
(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:		
(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:		
(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren		
(B) ART: Aminosäure		
(C) STRANGFORM: Einzel		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein		
(ix) MERkmale:		
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein		
(B) LAGE: 1..10		

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:  
**TCNGAUGUCA TTTAAGGARA R**  
 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:  
 (i) SEQUenz CHARAKTERISTIKA:  
   (A) LÄNGE: 21 Basenpaare  
   (B) ART: Nukleinsäure  
   (C) STRANGFORM: Einzel  
   (D) TOPOLOGIE: linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)  
 (ix) MERkmale:  
   (A) NAME/Schlüssel: exon  
   (B) LAGE: 1..21

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:  
**ATGATGGAYA AYTYYGTNAA R**  
 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:  
 (i) SEQUenz CHARAKTERISTIKA:  
   (A) LÄNGE: 42 Basenpaare  
   (B) ART: Nukleinsäure  
   (C) STRANGFORM: Einzel  
   (D) TOPOLOGIE: linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)  
 (ix) MERkmale:  
   (A) NAME/Schlüssel: exon  
   (B) LAGE: 1..42

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:  
**TAYAAGAYG ARAAGGATT YATGGAYGCN YTNAACARA AR**  
 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11:  
 (i) SEQUenz CHARAKTERISTIKA:  
   (A) LÄNGE: 60 Basenpaare  
   (B) ART: Nukleinsäure  
   (C) STRANGFORM: Einzel  
   (D) TOPOLOGIE: linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)  
 (ix) MERkmale:  
   (A) NAME/Schlüssel: exon  
   (B) LAGE: 1..60

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:  
**TAYGAYATHC CNGARCATA YMNGARATH ATHCCNCARA AYTNGCNGA RCYTYTNAAR**  
 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 12:  
 (i) SEQUenz CHARAKTERISTIKA:  
   (A) LÄNGE: 78 Basenpaare  
   (B) ART: Nukleinsäure  
   (C) STRANGFORM: Einzel  
   (D) TOPOLOGIE: linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:  
**GAYGCNATHG ARAARATAYGA RGAYATHCCN GARCATAYM GNGARATHAT HCCNCARAYA**  
 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 13:  
 (i) SEQUenz CHARAKTERISTIKA:  
   (A) LÄNGE: 54 Basenpaare  
   (B) ART: Nukleinsäure  
   (C) STRANGFORM: Einzel  
   (D) TOPOLOGIE: linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)  
 (ix) MERkmale:  
   (A) NAME/Schlüssel: exon  
   (B) LAGE: 1..54

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:  
**TTYCAGGNG ARYNTYNGC NGGNATHAAR CNTCTNYTG ARGARYTNAA RAAR**  
 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 14:  
 (i) SEQUenz CHARAKTERISTIKA:  
   (A) LÄNGE: 42 Basenpaare  
   (B) ART: Nukleinsäure  
   (C) STRANGFORM: Einzel  
   (D) TOPOLOGIE: linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)  
 (ix) MERkmale:  
   (A) NAME/Schlüssel: exon  
   (B) LAGE: 1..42

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:  
**CARTYCCNA THYTHACNTC NOTNTNTYTCN AYVGARGARA AR**  
 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 15:  
 (i) SEQUenz CHARAKTERISTIKA:  
   (A) LÄNGE: 42 Basenpaare  
   (B) ART: Nukleinsäure  
   (C) STRANGFORM: Einzel  
   (D) TOPOLOGIE: linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:  
**78**  
 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 16:  
 (i) SEQUenz CHARAKTERISTIKA:  
   (A) LÄNGE: 21 Basenpaare  
   (B) ART: Nukleinsäure  
   (C) STRANGFORM: Einzel  
   (D) TOPOLOGIE: linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)  
 (ix) MERkmale:  
   (A) NAME/Schlüssel: exon  
   (B) LAGE: 1..21

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:  
**20**  
 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 17:  
 (i) SEQUenz CHARAKTERISTIKA:  
   (A) LÄNGE: 54 Basenpaare  
   (B) ART: Nukleinsäure  
   (C) STRANGFORM: Einzel  
   (D) TOPOLOGIE: linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)  
 (ix) MERkmale:  
   (A) NAME/Schlüssel: exon  
   (B) LAGE: 1..54

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:  
**30**  
 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 18:  
 (i) SEQUenz CHARAKTERISTIKA:  
   (A) LÄNGE: 54 Basenpaare  
   (B) ART: Nukleinsäure  
   (C) STRANGFORM: Einzel  
   (D) TOPOLOGIE: linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)  
 (ix) MERkmale:  
   (A) NAME/Schlüssel: exon  
   (B) LAGE: 1..54

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:  
**35**  
 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 19:  
 (i) SEQUenz CHARAKTERISTIKA:  
   (A) LÄNGE: 54 Basenpaare  
   (B) ART: Nukleinsäure  
   (C) STRANGFORM: Einzel  
   (D) TOPOLOGIE: linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)  
 (ix) MERkmale:  
   (A) NAME/Schlüssel: exon  
   (B) LAGE: 1..54

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:  
**40**  
 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 20:  
 (i) SEQUenz CHARAKTERISTIKA:  
   (A) LÄNGE: 54 Basenpaare  
   (B) ART: Nukleinsäure  
   (C) STRANGFORM: Einzel  
   (D) TOPOLOGIE: linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)  
 (ix) MERkmale:  
   (A) NAME/Schlüssel: exon  
   (B) LAGE: 1..54

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:  
**45**  
 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 21:  
 (i) SEQUenz CHARAKTERISTIKA:  
   (A) LÄNGE: 42 Basenpaare  
   (B) ART: Nukleinsäure  
   (C) STRANGFORM: Einzel  
   (D) TOPOLOGIE: linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)  
 (ix) MERkmale:  
   (A) NAME/Schlüssel: exon  
   (B) LAGE: 1..42

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:  
**50**  
 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 22:  
 (i) SEQUenz CHARAKTERISTIKA:  
   (A) LÄNGE: 60 Basenpaare  
   (B) ART: Nukleinsäure  
   (C) STRANGFORM: Einzel  
   (D) TOPOLOGIE: linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)  
 (ix) MERkmale:  
   (A) NAME/Schlüssel: exon  
   (B) LAGE: 1..60

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:  
**55**  
 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 23:  
 (i) SEQUenz CHARAKTERISTIKA:  
   (A) LÄNGE: 60 Basenpaare  
   (B) ART: Nukleinsäure  
   (C) STRANGFORM: Einzel  
   (D) TOPOLOGIE: linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)  
 (ix) MERkmale:  
   (A) NAME/Schlüssel: exon  
   (B) LAGE: 1..60

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:  
**60**  
 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 24:  
 (i) SEQUenz CHARAKTERISTIKA:  
   (A) LÄNGE: 60 Basenpaare  
   (B) ART: Nukleinsäure  
   (C) STRANGFORM: Einzel  
   (D) TOPOLOGIE: linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)  
 (ix) MERkmale:  
   (A) NAME/Schlüssel: exon  
   (B) LAGE: 1..60

THIS PAGE BLANK (USPTO)